

インスリン様ピコリン酸-バナジル錯体の置換基効果

田山 小次郎, 安達 祐介, 安井 裕之, 桜井 弘
(京都薬科大学代謝分析学教室*)

Substituent effect of insulinomimetic vanadyl-picolinate complexes

Kojiro TAYAMA, Yusuke ADACHI, Hiroyuki YASUI and Hiromu SAKURAI
Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

【Summary】

We have developed various vanadyl complexes and found that the bis (picolinato) oxovanadium (IV) [VO(pa)₂] with the VO(N₂O₂) coordination mode is an effective agent for treating diabetes mellitus. Since then we used the complex as a leading compound for developing more active agents with hypoglycemic effect. By introducing an electron donating group such as an alkyl group into the pyridine ring of picolinic acid, we prepared bis (3-methylpicolinato)-oxovanadium (IV) [VO(3mpa)₂], and bis (6-methylpicolinato) oxovanadium (IV) [VO(6mpa)₂]. Blood glucose lowering effect and survival rate in the STZ-mice given such vanadyl complexes were found to change depending on the position of substituent.

様々な金属元素による血糖降下作用が現在までに報告されており、その中の一つに元素番号23のバナジウムがある。バナジウムは他の金属に比べて優れた血糖降下作用を有していることが報告されている¹⁾。バナジウムは様々な酸化状態をとることができるが、毒性が少なく血糖降下作用を示す4価バナジウム（バナジル）とトリプトファン代謝物であるピコリン酸との錯体VO(pa)₂が高いインスリン様作用を持つことが明らかにされている²⁾。我々は、これまでにVO(pa)₂をリード化合物として様々なピコリン酸誘導体バナジル錯体を合成し、優れた血糖降下作用を持つことを明らかにしている^{3,4)}。本研究ではVO(pa)₂をリード化合物として電子供与性基のメチル基を導入したピコリン酸誘導体-バナジル錯体を合成し、置換基および置換位置による*in vitro*インスリン様作用および*in vivo*血糖降下作用への影響を検討した。

【実験方法】

1. バナジル錯体の合成

水中で配位子とVOSO₄を2:1の割合で混合し、LiOHでpH 4-6に調整した。数時間加熱攪拌した後、沈殿した物質をろ別した。それを精製し、減圧乾燥して目的物を得た。元素分析、赤外吸収スペクトル、可視吸収スペクトル、ESRスペクトル、磁化率および質量分析よりバナジル錯体の構造を推定した。分配係数はlogP = log (C_{chloroform}/C_{hepes buffer})式を用いて算出した (C_{chloroform}:クロロホルム層におけるバナジウム錯体の濃度, C_{hepes buffer}:hepes buffer (pH 7.4)におけるバナジウム錯体の濃度)。

2. バナジル錯体の*in vitro*インスリン様作用

バナジル錯体のインスリン様作用の評価はNakaiらの方法に基づいて行った⁵⁾。ラット副腎丸周辺から得た白色脂肪

*所在地:京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

細胞をエピネフリンで刺激して放出される遊離脂肪酸 (FFA) を 50% 抑制するバナジル錯体の濃度を IC_{50} 値として評価した。

バナジル錯体のグルコース取り込み作用の評価は Adachi らの方法に基づいて行った⁶⁾。バナジル錯体のグルコース取り込み活性はグルコースの最大取り込み量を 100% とし、その取り込みを 50% 促進させるバナジウム錯体の濃度を EC_{50} 値として評価した。

3. バナジル錯体の *in vivo* 血糖降下作用

1型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン誘導糖尿病マウス (STZマウス) にバナジル錯体を単回腹腔内投与し、経時的に血糖値を測定した。バナジル錯体は5%アカシア溶液に懸濁させ投与した。

また、置換基の位置による影響をさらに検討するためSTZマウスにバナジル錯体を50日間連続経口投与し、血糖値、体重、摂食量および摂水量を測定した。バナジル錯体は5%アカシア溶液に懸濁させ投与した。

【結果と考察】

ピコリン酸にメチル基を導入したピコリン酸誘導体のバナジル錯体は配位子とバナジウムが2:1の割合で結合し、 $VO(pa)_2$ と同様に N_2O_2 型配位様式を取っていることが推定された (Fig. 1)。さらに、ピコリン酸にメチル基を導入することによりバナジル錯体の脂溶性が高くなることが分かった (Table 1)。

Fig. 1に示すバナジル錯体の脂肪細胞におけるインスリン様作用を評価した。その結果、すべてのバナジル錯体はFFAの放出抑制作用およびグルコースの取り込み作用を有することが示された。これはバナジウムがphosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) 経路における酵素や基質を活性化することにより cyclic-adenosine monophosphate (cAMP) の濃度を低下させFFAの放出を抑制させる作用や glucose transporterの細胞膜への移行を促進させグルコース取り込みを増加させる作用を示したためと考えられる⁷⁾。その中でも、メチル基をピコリン酸に導入したバナジル錯体は $VO(pa)_2$ に比べて有意にFFAの放出を抑制することがわかった。また、 $VO(3mpa)_2$ は $VO(pa)_2$ や $VO(6mpa)_2$ と

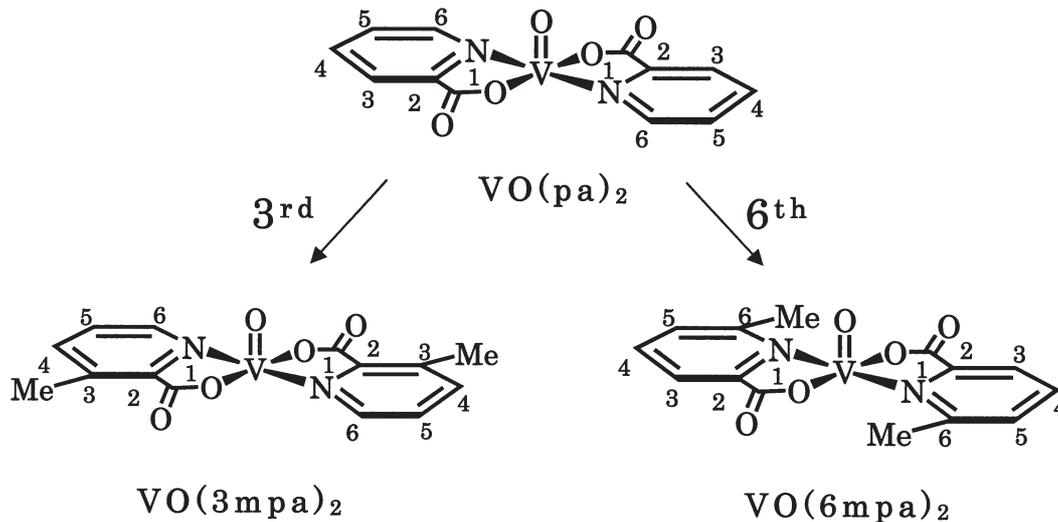


Fig. 1 Structures of vanadyl complexes

Table 1 Partition coefficient (LogP) for vanadyl complexes in chloroform and HEPES buffer. Data are expressed as the means \pm SDs for 3 experiments.

Complex	LogP
$VO(pa)_2$	-1.288 \pm 0.062
$VO(3mpa)_2$	-0.482 \pm 0.091
$VO(6mpa)_2$	-0.681 \pm 0.002

比べて有意に低いEC₅₀値を示し、より低濃度のバナジル錯体でグルコースを取り込むことが分かった (Table 2)。3位にメチル基を導入することによりそのバナジル錯体はグルコース取り込み作用が増加したが、同じメチル基を6位に導入したバナジル錯体ではグルコース取り込み作用を増加することはなかった。このことより、置換基を導入する位置が *in vitro*におけるグルコース取り込み作用に影響を与えることが明らかとなった。

続いて、1型糖尿病モデル動物であるSTZマウスにバナジル錯体を単回腹腔内投与するとVO(3mpa)₂において優れた血糖降下作用が認められた。これはバナジウムがグルコース取り込みやグリコーゲンの合成を促進し、糖新生を抑制することより血液中のグルコースを低下させ糖尿病における高血糖状態を是正したと考えられる⁷⁾。単回腹腔内投与では、1型糖尿病モデルマウスにおいてVO(3mpa)₂は優れた血糖降下活性を有することが見出されたが、VO(6mpa)₂およびVO(pa)₂においては血糖降下作用が認められなかった (Fig. 2)。置換基を導入する位置が *in vivo*における血糖降下作用に影響を与えることが明らかとなった。

続いて、置換基の位置による影響をさらに検討するため経口投与におけるバナジル錯体の血糖降下作用を検討した。VO(3mpa)₂およびVO(6mpa)₂を50日間毎日経口投与したところ、VO(3mpa)₂はVO(6mpa)₂に比べて強い血糖降下活

Table 2 Standardized insulinomimetic activities of vanadyl complexes

Complex	FFA-release IC ₅₀ (mM)	Glucose-uptake EC ₅₀ (μM)
VO(pa) ₂	1.00 ± 0.05	100 ± 3
VO(3mpa) ₂	0.74 ± 0.02 ** ^{††}	92 ± 4 *
VO(6mpa) ₂	0.82 ± 0.02 **	103 ± 1

Data are expressed as the means ± SDs for 3 experiments.

Significance : * $p < 0.05$ versus VO(pa)₂

** $p < 0.01$ versus VO(pa)₂

[†] $p < 0.05$ versus VO(6mpa)₂

^{††} $p < 0.01$ versus VO(6mpa)₂

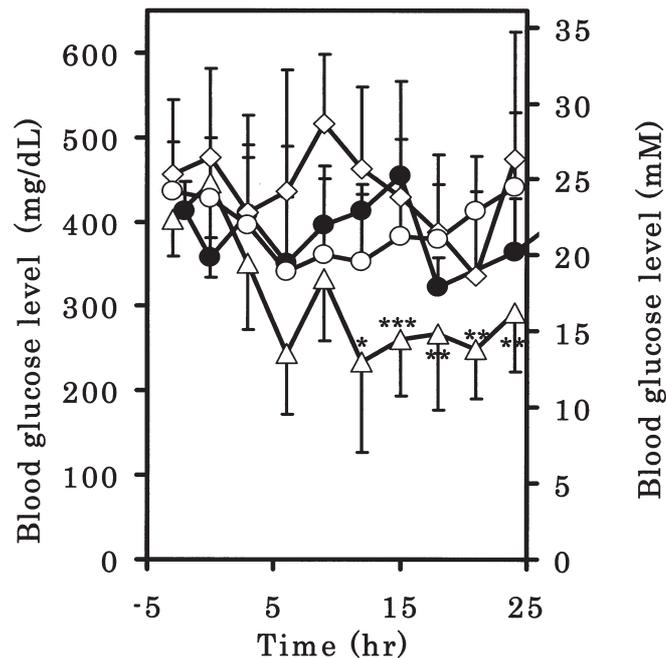


Fig. 2 Changes of blood glucose levels in (●) STZ mice and STZ mice treated with vanadyl complexes such as (○) VO(pa)₂, (△) VO(3mpa)₂, or (◇) VO(6mpa)₂ at a dose of 10 mgV/kg of body weight by a single i.p. injection. The complexes were dissolved in 5% acacia. Each point is expressed as the mean value ± SD for 5-9 mice. Significance at * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus control STZ mice

性を有していることがわかった (Fig. 3)。さらに、投与後50日目におけるHbA_{1c}がVO(3mpa)₂において有意に低下していることから血糖値が持続的に改善されていることが示された (Fig. 4)。また、VO(3mpa)₂はVO(6mpa)₂より生存率が増加し、毒性が減少していることが明らかとなった (Fig. 5)。これは錯体投与によりバナジウムの臓器分布が異なるためではないかと推測している。しかし、今回は投与終了後においてVO(6mpa)₂群に十分な数のマウスが生存していなかったため、バナジウムの臓器分布を評価することが出来なかった。今後、バナジウム錯体を投与した糖尿病動物におけるバナジウムの臓器移行性を評価する実験を進めていきたいと考えている。投与期間中にVO(3mpa)₂とVO(6mpa)₂において摂食量、摂水量、体重に有意な差はみられなかったがVO(3mpa)₂投与群では摂食量、摂水量がVO(6mpa)₂と比較して低くなる傾向が認められた。経口投与においてもバナジル錯体の置換位置の違いが血糖降下作用に影響していることが示された。さらには安全性にも影響していることが明らかとなった。

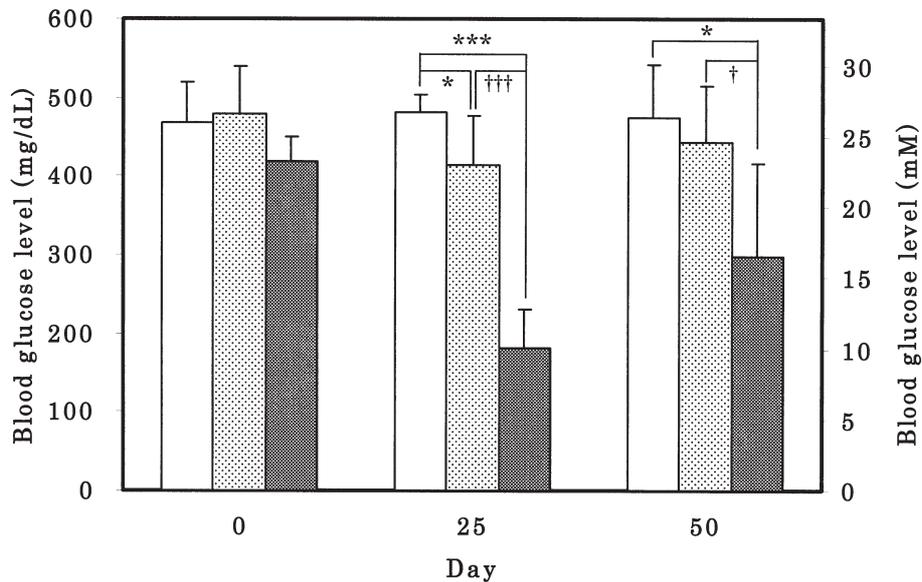


Fig. 3 Change of blood glucose levels in (□) STZ mice and STZ mice treated with (▨) VO(6mpa)₂ or (▩) VO(3mpa)₂ by daily oral administrations for 50 days. Dose were 20 mgV/kg of body weight in 5% acacia. Data are expressed as the mean value ± SD for 4-7 mice. Significance at **p*<0.05, ****p*<0.001 versus control STZ mice. Significance at †*p*<0.05, ††*p*<0.001 versus VO(6mpa)₂.

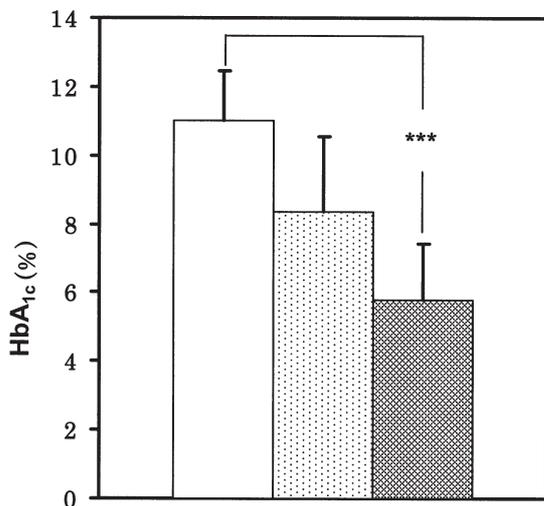


Fig. 4 Changes of HbA_{1c} levels in (□) STZ mice and STZ mice treated with (▨) VO(6mpa)₂ or (▩) VO(3mpa)₂ by daily oral administrations for 50 days. Dose were 20 mgV/kg of body weight in 5% acacia. Data are expressed as the mean value ± SD for 4-7 mice. Significance at ****p*<0.001 versus control STZ mice

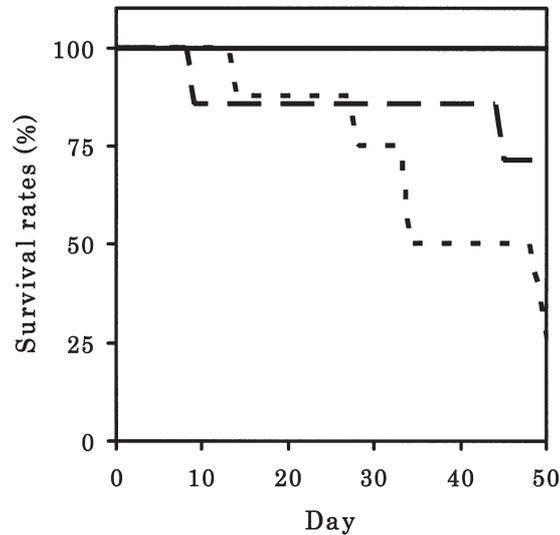


Fig. 5 Survival rates of (—) STZ mice and STZ mice treated with (····) VO(6mpa)₂ or (---) VO(3mpa)₂ by daily oral administrations for 50 days. Dose were 20 mgV/kg of body weight in 5% acacia. Values are means \pm SD for 4-7 mice

以上の結果より *in vitro* および *in vivo* において VO(3mpa)₂ は優れたインスリン様作用を示すことが明らかとなった。これは *in vitro* におけるグルコースの取り込み活性が VO(3mpa)₂ で有意に高いことさらに、著者らの以前の研究により VO(3mpa)₂ が VO(6mpa)₂ よりも静脈内投与後におけるバナジル種の血中滞留性が増大することが示されており、血中滞留性の増大が持続的な血糖降下作用を示すと考えられる³⁾。我々の研究室では以前、STZラットを用いて VO(6mpa)₂ に優れた血糖降下作用を認め、かつ投与中止後も血糖降下作用が持続する結果を得た^{8, 9)}。しかし、動物種や実験モデル動物が異なっていることや糖尿病状態が前回に比べ重症な条件を用いていることなどが影響し、本研究の STZマウスを用いた結果からは、VO(6mpa)₂ に強い血糖降下作用を示さなかった。バナジル錯体の経口投与による消化管からの吸収性も血糖降下作用に深く関与するため¹⁰⁾、今後糖尿病モデル動物における吸収性を評価する予定である。

本研究の結果から、同じ置換基を導入しても置換基を導入する位置により *in vitro* および *in vivo* におけるインスリン様作用に差が認められ、さらには安全性にも影響していることが明らかとなった。

【文 献】

- 1) Thompson KH, Chile J, Yuen VG, Tse J, McNeill JH, Orvig C (2004) Comparison of anti-hyperglycemic effect amongst vanadium, molybdenum and other metal maltol complexes. *J Inorg Biochem* 98: 683-690.
- 2) Sakurai H, Fujii K, Watanabe H, Tamura H (1995) Orally active and long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex: bis(picolinato)oxovanadium(IV). *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1095-1101.
- 3) Sakurai H, Yasui H (2003) Structure-activity relationship of insulinomimetic vanadyl-picolinato complexes in view of their clinical use. *J Trace Elem Exper Med* 16: 269-280.
- 4) Sakurai H, Yasui H, Adachi Y (2003) The therapeutic potential of insulin-mimetic vanadium complexes. *Expert Opin* 12(7): 1189-1203.
- 5) Nakai M, Watanabe H, Fujisawa C, Satoh T, Takada J, Matsushita R, Sakurai H (1995) Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol Pharm Bull* 18: 719-726.
- 6) Adachi Y, Sakurai H (2004) Insulin-mimetic vanadyl(IV) complexes as evaluated by both glucose-uptake and inhibition of free fatty acid(FFA)-release in isolated rat adipocytes. *Chem Pharm Bull* 52(4): 428-433.

- 7) Srivastava AK, Mehdi MZ (2004) Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet Med.* 22: 2-13.
- 8) Fujimoto S, Fujii K, Yasui H, Matsushita R, Takada J, Sakurai H (1997) Long-term acting and orally active vanadyl-methylpicolinate complex with hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr* 23: 113-129.
- 9) Fujisawa Y, Sakurai H (1999) Evidence for the improvement of noninsulin-dependent diabetes mellitus in KKAY mice with daily oral administration of bis(6-methylpicolinate)oxovanadium(IV) complex. *Chem Pharm Bull* 47 (11): 1668-1670.
- 10) Fugono J, Yasui H, Sakurai H (2001) Pharmacokinetic study on gastrointestinal absorption of insulinomimetic vanadyl complexes in rats by ESR spectroscopy. *J Pharm Pharmacol* 53(9): 1247-1255.